Ueber Technik der Oxydasereaktion und ihr Verhalten an Monozyten

---

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
an der
Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

Von

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Fritz Schlenner
aus Berlin

Tag der Promotion: 27. Juli 1920

Emil Ebering, Berlin NW. 7, Mittelstraße 29.

300

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. **Rubner**
Referent: Prof. Dr. **His**

Es gibt drei Arten von Oxydationsfermenten, nämlich Oxygenasen, Peroxydasen und Katalasen; die Oxydasen selbst stellen ein Gemisch von Oxygenasen und Katalasen dar und haben die Eigenschaft, Guajaktinktur durch Bildung von Guajakblau blau zu färben. Die Geschichte der Indophenolblausynthese geht auf Ehrlich zurück. Er stellte fest, daß nach subkutaner oder intravenöser Injektion eines Gemisches von α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin in ein Kaninchen Herz, Gehirn, Nieren und bestimmte Muskelgruppen des Tieres sich durch Bildung von Indophenolblau blau färbten. Er zog daraus den Schluß, daß diese sich blau färbenden Organe nur eine geringe Oxydationskraft besäßen, und daß im Gegensatz zu ihnen die nicht blau gefärbten Organe die Eigenschaft hätten, das sich im Körper bildende Indophenolblau zu Indophenolweiß zu reduzieren.

Später wurde dann die Reaktion erst von Röhmann und Spitzer wieder aufgenommen. Sie konstatierten eine Blaufärbung in einem Gemisch von α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin, das mit einem Organbrei in Berührung kommt, und zwar zeigte sich diese Bläuung schon nach wenigen Minuten. Winkler war es dann, der die Oxydasereaktion weiter anwandte und feststellen konnte, daß das Protoplasma der polynukleären Leukozyten mit blauen Körnchen ausgefüllt war, die Kerne dagegen nicht. Denselben Befund konnte er an Leukozyten des Knochenmarkes und von Milzausstrichen erheben (zitiert nach Schultze in Zieglers Beiträgen zur pathologischen Anatomie und allgemeinen Pathologie, 1909, Band 45).

W. H. Schultze war es, der als erster die Oxydasereaktion weiter ausbaute und sie an Gefrierschnitten von Formolpräparaten anwandte. Dabei fand er eine blaue Granulierung der Elemente der myeloischen Leukozytenreihe. Und zwar wird nach Schultze der Farbstoff in der Zelle selbst gebildet; daraus, daß nur die granulierten Zellen eine solche Farbstoffbildung aufweisen, schließt er, daß die Körnchen selbst die sauerstoffübertragende Substanz enthalten.

Meine Aufgabe war es nun, den Ausfall der Oxydasereaktion bei den Monozyten einer Prüfung zu unterziehen. Nicht nur an Organschnitten läßt sich die Reaktion ausführen, son-

dern auch an Blutpräparaten. Zu meinen Untersuchungen verwendete ich die Ehrlichsche Methode der Deckglas-Trockenpräparate und die gewöhnliche bekannte Ausstrichmethode. Mit dem Ehrlichschen Verfahren habe ich indessen keine so schönen Bilder erzielt, denn es ergibt eine ungleichmäßige Verteilung der Blutschicht, während bei der Ausstrichmethode die Blutzellen über den ganzen Objektträger in gleichmäßig dünner Schicht verteilt sind. Bei der Ausführung der Oxydasereaktion gebe ich der Vorschrift von v. Gierke den Vorzug, der sowohl das α-Naphthol als auch das Dimethylparaphenylendiamin in physiologischer Kochsalzlösung löst in der Menge von 1 %. Schultze verwendet zur Lösung des α-Naphthol kochendes Wasser und tropft so viel Natronlauge hinzu, bis alles Naphthol in Lösung gegangen ist. Eine völlige Lösung des α-Naphthol scheint mir jedoch nicht einzutreten, ein Teil bleibt ungelöst, bezw. suspendiert im Wasser erhalten. Außerdem hat die alkalische Lösung den Nachteil, daß, wie auch v. Gierke angibt, die Zellen aufquellen und sogar ihre histologische Struktur verlieren. Ferner findet er, daß Alkalizusatz die Reaktion ganz aufhebt oder, in schwächerer Konzentration angewendet, sie ganz erheblich stört, so daß die Zellen statt distinkter blauer Granulierung eine diffuse Bläuung bezw. undeutliche Bestäubung aufweisen (Münchener medizinische Wochenschrift 1911, Nr. 44). Auch Gräff (Zentralblatt für Pathologie 1916, Nr. 14) findet, daß der Zusatz von Lauge zum Zwecke der besseren Lösung der α-Naphthol- zum mindesten überflüssig ist, außerdem werde dadurch am frischen Präparat die Darstellung der Oxydase-Granula in den Gewebszellen unmöglich. Nach Nakano hemmt der Zusatz von Alkali die Entfaltung der kompletten Oxydasewirkung, und er schlägt daher vor, nur völlig neutrale Lösungen zu verwenden (Folia haematologica 1913, Band XV, Heft 1). Diese Uebelstände werden bei der Lösung sowohl des α-Naphthol als auch des Dimethylparaphenylendiamin in physiologischer Kochsalzlösung umgangen, die Zellen behalten ihre Gestalt und ihre Struktur bei. Zur Anstellung der Reaktion gibt Schultze an, beide Lösungen sollen zu gleichen Teilen gemischt werden. Dieses Mischungsverhältnis scheint mir zu konzentriert, denn bei dem genannten Verfahren nehmen die meisten Blutzellen einen nicht nur blauen Farbton an, sondern sie werden fast schwarz, und von dem Kern ist kaum noch etwas sichtbar. Eine Verdünnung des Gemisches der beiden Lösungen erscheint also ratsam, und zwar mit der doppelten Menge destillierten Wassers; also z. B,

α-Naphthol (1 %ig in NaCl 0,9)
Dimethyl-p-Phenylendiamin (1 %ig in NaCl 0,9) āā. 2,0
Aq. dest. 8,0

Bei diesem Konzentrationsverhältnis wird nicht die Gesamtheit der weißen Blutzellen von dem sich bildenden Indophenolblau gebläut, sondern man sieht sie mit blauen Körnchen besetzt, die im Protoplasma liegen, während der Zellkern ungefärbt bleibt.

Um nun die Kerne und diejenigen Arten der weißen Blutzellen sichtbar zu machen, die keine Oxydasereaktion geben, muß eine Gegenfärbung vorgenommen werden. Dazu kann z. B. Karbolfuchsin verwendet werden, etwa 1 ccm derselben Lösung, wie sie etwa zum Nachweis von Tuberkelbazillen dient, auf 25 bis 30 ccm destilliertes Wasser. Dabei werden die Kerne der neutrophilen, eosinophilen und basophilen Leukozyten rot gefärbt und heben sich also von dem mit blauen Granulis besetzten Protoplasma deutlich ab. Die durch das Indophenolblau nicht gefärbten Klassen der meisten Blutzellen werden dadurch sichtbar, daß ihre Kerne gleichfalls den roten Farbton des Karbolfuchsins annehmen, während ihr Protoplasma nur ganz schwach rosa gefärbt wird. Die Erythrozyten erscheinen als blaßrote Scheiben.

Eine schönere Kontrastfärbung als das Karbolfuchsin ergibt altes, gut gereiftes Borax-Methylenblau; in frischer Lösung ist es nicht anwendbar und von seiner Brauchbarkeit muß man sich von Fall zu Fall durch Ausprobieren überzeugen. Es resultiert dabei eine Färbung, die der Giemsaschen ähnelt, denn die Kerne und die oxydasefreien Blutzellen nehmen einen violetten Farbton an (nach Angaben von V. Schilling*).

Ferner wurden Versuche mit Neutralrot als Gegenfarbmittel angestellt. Dabei ergab sich jedoch, daß durch diesen Farbstoff die Intensität der Oxydasereaktion zu ihrem Nachteil beeinflußt wird. Sie blaßt nämlich gleich bei Zusatz des Neutralrots so stark ab, daß die ursprünglich durch das Indophenolblau blau tingierten Zellen diese ihre Blaufärbung bis auf einen geringen bläulichen Schimmer einbüßen. Auch die Zellen ohne Oxydasereaktion nehmen anscheinend das Neutralrot nur ungern auf, denn sie erscheinen bei der Betrachtung unter dem Mikroskop nur schwach rotbraun gefärbt, sind also schwer zu erkennen, und Lymphozyten und Monozyten sind oft nur ungenau voneinander zu trennen. Wässrige Lösungen von Hämatoxylin und Hämalaun können gleichfalls als Gegenfärbemittel verwendet werden. Ich kann also die Angaben von Schilling bestätigen, daß Borax-Methylenblau, Karbolfuchsin für Ausstriche und ferner Hämalaun und Hämatoxylin für Schnitte zur Erkennung der Zellarten besonders geeignet sind.

In der Literatur finden sich über Gegenfärbungen nur drei

* „Technik der Blutfärbung" in Uhlenhuts Handbuch der mikroskopischen Technik (im Druck).

Angaben, nämlich bei Winkler (Folia haematologica, 1912, Band XIV), der zur Kernfärbung eine Lösung von Neutralrot anwandte und bei Fursenko (Zieglers Beiträge zur pathol. Anatomie und allgem. Pathologie, 1911, Band 22), der die Kernfärbung gleichfalls mit gesättigter wässriger Neutralrotlösung oder mit Methylgrün-Pyronin ausführte. Auf diese Weise erhielt er sogar brauchbare Dauerpräparate, nachdem sie die Alkoholreihe und Xylol passiert hatten und in Kanadabalsam eingeschlossen worden waren. Als dritter schlägt v. Gierke eine kurze Gegenfärbung mit Lithionkarmin vor (Münchener medizinische Wochenschrift, 1911, Nr. 44).

Mit einigen Worten sei auf die Technik der Gegenfärbung eingegangen. Besonders zu empfehlen ist das Arbeiten an unfixiertem Material in der Weise, daß, nachdem die Oxydasereaktion angestellt ist, an einer Kante des Deckglases einige Tropfen des Farbstoffes, also z. B. Borax-Methylenblau, mit einer feinen Pipette auf den Objektträger gebracht werden. An die gegenüberliegende Deckglaskante wird ein Stückchen Fließpapier gelegt und mit diesem die unter dem Deckglase befindliche Flüssigkeit angesaugt. Die Farblösung folgt dann nach, verteilt sich gleichmäßig auf die ganze Fläche des Blutausstriches, der von dem Deckglas bedeckt ist, und färbt so Kern und Blutzellen in der angegebenen Weise (Schilling).

Die auf diese Art hergestellten Präparate können sofort unter dem Mikroskop untersucht werden. Die Zeit zur Herstellung eines solchen Präparates beträgt etwa drei bis vier Minuten. Diese Art des Operierens ist also sehr bequem und kann stets schnell ausgeführt werden. Freilich sind die so erhaltenen Präparate nur für wenige Stunden brauchbar, denn sie sind unfixiert, und die durch die Oxydasereaktion blau gefärbten Zellen blassen bald ab und verlieren den blauen Farbton. Außerdem trocknet die Flüssigkeit unter dem Deckglas bald ein. Dauerpräparate können nach der Vorschrift hergestellt werden, die W. H. Schultze für Organschnitte angegeben hat, und zwar auf folgende Weise: Zunächst werden die Blutausstriche in Formolalkohol zwei Stunden lang fixiert oder in einer mit 10-prozentigem Formalin beschickten feuchten Kammer nur einige Minuten lang. Dann wird auf dem Blutausstrich die Oxydasereaktion angestellt, indem ein Gemisch der Lösungen von α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin in physiologischer Kochsalzlösung darauf verteilt wird. Zur Herstellung von Dauerpräparaten müssen beide Farblösungen 1-prozentig, also nicht verdünnt, genommen werden, da sonst nach Fertigstellung des Präparates die Reaktion so schwach ist, daß sie kaum mehr zu erkennen ist. Nach drei bis vier Minuten wird das Gemisch der Farblösungen abgespült, und der Blutausstrich kommt in eine mit Wasser verdünnte Lugolsche Lösung (1 : 2 Aq.

dest.) auf 8 bis 10 Minuten und dann in Wasser, dem etwas von einer Lösung von Lithium carbonicum zugesetzt ist. Darin muß das Präparat 24 Stunden oder beliebig länger stehen. Zum Schluß wird mit Alaunkarmin oder besser mit Hämalaun kurz nachgefärbt. Die damit erzielten Resultate sind indessen bei weitem nicht so schön wie die, welche man am unfixierten Präparat erhält. Denn erstens bleibt die Oxydasereaktion nicht blau, sondern sie wird schwarz, und zweitens wird sie merklich blasser. Auch die von Schultze angegebene Nachfärbung mit Alaunkarmin gibt keinen schönen Ton, denn die Blutzellen erhalten eine nur schwache rotviolette Farbennüance. Die Ergebnisse mit Hämalaun zur Nachfärbung scheinen besser zu sein, vorausgesetzt, daß man die Präparate nicht länger als etwa eine bis zwei Minuten damit behandelt.

Für die Arbeiten des Praktikers eignet sich die von Schilling besonders empfohlene Methode am unfixierten Präparat am meisten.

Neben Blutausstrichen wurden ferner Organpräparate hergestellt, in erster Linie von Milz und Leber. Im allgemeinen habe ich dazu Organstücke benutzt, die in Gelatine eingebettet waren (nach den Anweisungen von Schmorl in seinem Buch „Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden") und dann mit dem Gefriermikrotom geschnitten wurden. Auf diese Weise lassen sich bequem Schnitte von 5 bis 7 μ herstellen, und die Umständlichkeit der Gelatine-Einbettung wird dadurch völlig wettgemacht.

Die Schnitte wurden teils fixiert, teils unfixiert der Oxydasereaktion ausgesetzt, ebenso wie die Blutausstriche, also entsprechend der Schultzeschen Vorschrift. Zur Gegenfärbung am fixierten Präparat eignet sich in erster Linie eine wässrige Lösung von Hämalaun, mehr noch, als es bei den Blutausstrichen der Fall war. Die Resultate sind ebenfalls an unfixiertem Material schöner als an fixiertem, denn die Zellen, die die Oxydasereaktion geben, erscheinen nach der Fixierung fast schwarz und nicht mehr blau, und außerdem ist die Stärke der Reaktion bedeutend schwächer geworden. v. Gierke sagt sogar: „nach Formolfixierung ist die Reaktion vernichtet" (Münchener medizinische Wochenschrift 1911, Nr. 44).

Bei der Anstellung der Oxydasereaktion am Organschnitt empfiehlt es sich, das Gemisch der beiden Farbstofflösungen nicht so stark zu verdünnen wie für Blutausstriche. Entweder muß man α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin unverdünnt zu gleichen Teilen verwenden- oder das Gemisch höchstens zur Hälfte mit Wasser verdünnen; z. B.

α-Naphthol (1 %ig in NaCl 0,9)
Dimethyl-p-Phenylendiamin (1 %ig in NaCl 0,9) aq. 2,0
Aq. dest. 4,0

Auch Gräff schlägt eine schwächere Konzentration vor (Zentrbl. für Pathologie 1916, Nr. 14), denn bei Verwendung stärkerer Lösungen entsteht schon kurz nachdem die Schnitte eingelegt sind, in der Färbeflüssigkeit ein blauer Farbstoff, gleichzeitig mit dem Eintritt der Reakton im Schnitt; und durch diesen Farbstoff entsteht eine diffus blaue Tönung des ganzen Schnittes. Er befürwortet daher folgende Konzentrationsverhältnisse:

0,5 α-Naphthol in 250—300,0 aq. dest. und 0,5 Dimethyl-p-Phenylendiamin in 250—300,0 aq. dest. und färbt 10 bis 15 Minuten in einem Gemisch beider Lösungen. Dem von Gräff erwähnten Uebelstande der gleichzeitigen Farbstoffbildung in der Färbeflüssigkeit und im Schnitt kann man dadurch begegnen, bezw. ihn auf ein Mindestmaß zurückführen, daß man beide Farbstofflösungen getrennt nacheinander verwendet und den Schnitt in jeder Lösung etwa 10 Minuten liegen läßt, Gelatineschnitte, wie ich sie zu meinen Untersuchungen fast ausschließlich verwandte, etwa 15 Minuten. W. H. Schultze wendet gegen die Gräffsche Technik ein, daß er mit alkalischer Lösung von αNaphthol und konzentrierter wässriger Lösung von Dimethylparaphenylendiamin (0,5 auf 50,0) stets gute Resultate erhalten habe, und erklärt die Mißerfolge Gräffs durch die nicht richtige Anstellung der Reaktion (Zentralblatt für Pathologie 1917, Bd. 28). Gerade alkalische K-Naphthol-Lösung und konzentrierte Dimethylparaphenylendiamin-Lösung gehörten zusammen. Meine Angabe, daß man bessere Resultate erziele, wenn man beide Farblösungen getrennt von einander verwendet, steht im Widerspruch zu der von v. Gierke, der sagt, die Reaktion müsse im Gemisch vorgenommen werden, da das Verweilen in der α-Naphtol-Lösung allein für die Präparate schädlich sei (Münchener medizinische Wochenschrift 1911, Nr. 44).

Bei zu kurzer Zeit der Einwirkung der Färbeflüssigkeiten zeigen nur die Zellen in den Randpartien die Oxydasereaktion, während die zentralwärts gelegenen noch ganz ohne Blaufärbung sind. Es mag das daran liegen, daß das Farbstoffgemisch erst die zur Einbettung benutzte Gelatine durchdringen muß, ehe es an den Schnitt des Organs selbst gelangt und in diesem die Reaktion hervorrufen kann.

Die besten und klarsten Bilder erhält man, wenn man, wie oben schon erwähnt, bei Gewebsschnitten die beiden Farbstofflösungen nacheinander anwendet. Für Blutausstriche eignet sich dieses Verfahren ebenfalls, wenn man die Methode des

Durchsaugens unter dem Deckglas anwendet; man kann dann die Reaktion unter dem Mikroskop eintreten sehen.

Ich wende mich nun zu den erhaltenen Resultaten. Bei meinen Untersuchungen an Blutausstrichen und Ehrlichschen Deckglas-Trockenpräparaten verwandte ich fast ausschließlich Lösungen von α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin in physiologischer Kochsalzlösung und verdünnte davon je 2 ccm mit je 4 ccm Aqua destillata. Zur Gegenfärbung benutzte ich Karbolfuchsin oder Borax-Methylenblau.

Zur Untersuchung gelangte außer Tierblut zunächst Blut von gesunden Personen und von solchen Kranken, deren Blutbild keine wesentliche Veränderung darbot, z. B. je ein Fall von chronischer Nephritis, bezw. Magenkarzinom. Im ganzen waren es 13 Präparate. Zur Kontrolle wurde stets ein zweiter Ausstrich nach Giemsa gefärbt. An beiden Ausstrichen wurden alle weißen Blutzellen mit Hilfe der Schillingschen Differential-Zähltafel ausgezählt und registriert. Es sollte dadurch eine Kontrolle bezweckt werden, insofern als die bei beiden Auszählungen erhaltenen Werte für die verschiedenen Arten der weißen Blutkörperchen verglichen werden konnten. Besonderes Gewicht mußte auf die Abgrenzung der Monozyten und der Lymphozyten voneinander gelegt werden, wobei sich mitunter Schwierigkeiten ergeben. Außerdem ist das Aussehen der weißen Blutkörperchen in dem nach Giemsa gefärbten Ausstrich ein erheblich anderes als in dem, bei welchem die Oxydasereaktion angestellt ist. Am ähnlichsten ist noch das mit Borax-Methylenblau erhaltene Bild. Im großen und ganzen konnten die Monozyten jedoch an ihren charakteristischen Merkmalen erkannt werden, nämlich 1. an ihrer Größe, 2. an dem Kern, der im Verhältnis zum Protoplasma nicht so groß wie bei den Lymphozyten ist, 3. an der Buchtung und Lappung des Kernes und 4. an der azurophilen Granulierung.

Bei Anstellung der Oxydasereaktion erschienen neutrophile, eosinophile, basophile Leukozyten und Myelozyten deutlich positiv, d. h. ihr Protoplasma war mit leuchtend blau gefärbten Granulis angefüllt; ihre Kerne hoben sich bei Gegenfärbungen mit Borax-Methylenblau bezw. Karbolfuchsin durch ihre violette, bezw. rote Farbe deutlich ab. Lymphozyten und Erythrozyten waren im Gegensatz dazu nur violett oder nur rot gefärbt, also frei von Oxydasen. Ebenso verhielten sich die Monozyten: in der überwiegenden Zahl zeigten sie keine Oxydasereaktion. Einige Einschränkungen sind freilich erforderlich. Wenn die Reaktion mit unverdünnten Lösungen der beiden Farbstoffe angestellt wird, so sind oft über das ganze Präparat vereinzelte blaue Granula verteilt, und man sieht in jedem Gesichtsfeld eine gewisse Zahl

solcher Körnchen über alle Zellen ohne Oxydasereaktion ausgebreitet, also über Erythrozyten, Lymphozyten und Monozyten. Es handelt sich vielleicht um Körnchen, die von neutrophilen Leukozyten losgerissen und überallhin ausgeschwemmt sind, oder es sind allgemeine Niederschläge durch gelöste Oxydasen.

Ferner konnte ich folgendes beobachten: wenn ein Monozyt neben einer deutlich blau gefärbten Blutzelle liegt, so ist oft die Seite des Monozyten, die er jenem Oxydase-positiven Granulozyten zukehrt, mit blauen Körnchen bedeckt. Diese nehmen nach der dem Granulozyten abgewandten Seite an Häufigkeit ab. Es haben sich also in diesem Falle einzelne Körnchen von dem Granulozyten abgelöst und auf dem Monozyten niedergeschlagen. Dasselbe Schauspiel kann man gleichfalls sehen, wenn neben dem Granulozyten eine andere nicht granulierte Zelle liegt, also ein Lymphozyt oder ein Erythrozyt. Es ist dann die ganze Umgebung der granulierten Zelle in einem gewissen Umkreis mit blauen Körnchen bedeckt, die sich auch auf eine zufällig dort liegende Blutzelle niedersetzen, sei es ein Monozyt, ein Lymphozyt oder ein Erythrozyt. Es kann ferner vorkommen, daß ein Granulozyt zerquetscht oder ganz und gar weggeschwemmt ist. Man sieht dann nur noch kleine blaue Granula in dem Zellkontur als Rest. Befindet sich nun ein Monozyt gleichfalls in der Nachbarschaft, so ist er mehr oder weniger mit blauen Granulis bedeckt, und es könnte den Anschein haben, als sei er Oxydase-positiv. Das ist indessen nicht zutreffend, sondern es handelt sich um blaue Körnchen, die exogener Natur sind und sich nur zufällig auf dem Monozyten niedergeschlagen haben. Indessen habe ich hin und wieder einen Monozyten gesehen, der in geringem Grade eine blaue Bestäubung zeigte, ohne daß ein Granulozyt mit Oxydasereaktion in seiner Nähe gelegen hätte. Ob es sich dabei um exogene Granula handelte, die sich nur zufällig aus irgend einem Grunde auf dem Monozyten angesiedelt hatten, wage ich nicht zu entscheiden. Nicht ganz auszuschließen ist es, daß die Verfärbung in der Umgebung der Granulozyten durch gelöste Oxydasen und ihre Aufnahme in die zelligen Elemente geschieht, die dann zum Niederschlag der Körnchen führt.

Endlich möchte ich auf eine Erscheinung aufmerksam machen, die ich ab und zu beobachten konnte: in seltenen Fällen hatte es den Anschein, als ob die Gegend um das Zentrosoma oder die Kernbuchtung bei den Monozyten in Bezug auf die Anhäufung von Oxydase-positiven Körnchen bevorzugt sei. Diese Bilder sah ich aber, wie gesagt, nur ganz vereinzelt und selten. Im großen und ganzen überwogen solche Monozyten, die keine Oxydasereaktion gaben.

Im folgenden gebe ich die Durchschnittswerte der weißen

Blutkörperchen von den oben erwähnten 13 Fällen, in Prozenten ausgedrückt, wieder, und zwar seien zuerst die Durchschnittszahlen von 11 Auszählungen vom Blut gesunder Personen angeführt:

	Bei Giemsafärbung	bei Oxydasereaktion
Granulozyten	68,45 %	69,41 %
Lymphozyten	22,50 %	20,91 %
Monozyten	9,05 %	9,68 %

Unter Granulozyten sind neutrophile, eosinophile und basophile Leukozyten verstanden, die wohl bei Giemsafärbung voneinander zu unterscheiden sind, bei Anstellung der Oxydasereaktion jedoch nur sehr schwierig oder gar nicht.

Es folgen die Durchschnittszahlen der beiden Fälle von Magenkarzinom und chronischer Nephritis:

	bei Giemsafärbung	bei Oxydasereaktion
Granulozyten	65,0 %	68,5 %
Lymphozyten	24,0 %	21,5 %
Monozyten	11,0 %	10,0 %

Meine Untersuchungen erstreckten sich ferner auf drei Fälle mit Monozytosen und folgenden Durchschnittszahlen für weiße Blutkörperchen:

	bei Giemsa-Färbung:	bei Oxydase-Reaktion
Granulozyten	69,00 %	73,00 %
Lymphozyten	16,33 %	13,67 %
Monozyten	14,67 %	13,33 %

Das Resultat war bei zweien der Fälle für Monozyten völlig oxydasefrei, und in dem dritten Fall schien eine Anhäufung von blauen Körnchen in der Umgebung des Zentrosoma zu bestehen, wobei der innerste Teil am intensivsten blau gefärbt war, während die Menge der Granula abnahm, je weiter sie davon entfernt lagen.

Ferner gelangten zwei Malariafälle zur Untersuchung; die Durchschnittsprozentzahlen sind folgende:

	bei Giemsa-Färbung:	bei Oxydase-Reaktion
Granulozyten	67,75 %	68,20 %
Lymphozyten	18,00 %	18,40 %
Monozyten	14,25 %	13,40 %

In beiden Präparaten war wiederum die Mehrzahl der Monozyten ohne Oxydasereaktion; einzelne, die in der Nähe von dicht mit blauen Körnchen besetzten Neutrophilen lagen, waren auf der diesen Zellen zugewandten Seite mit blauen Körnchen belegt. Daß diese aber nicht für eine positive Oxydasereaktion der Monozyten gehalten werden dürfen, ergibt sich schon daraus, daß auch einzelne Lymphozyten, die dicht neben neutrophilen Leukozyten lagen, teilweise mit denselben Körnchen belegt waren.

Ein Typhusfall hatte folgende Prozentzahlen:

	bei Geimas-Färbung:	bei Oxydase-Reaktion;
Eosinophile Leukozyten	1,0 %	—
Basophile Leukozyten	—	—
Stabkernige Leukozyten	11,5 %	12,5 %
Segmentkernige Leukozyten	46,0 %	45,5 %
Lymphozyten	35,0 %	34,5 %
Monozyten	6,5 %	7,5 %

Hier waren gleichfalls die meisten der Monozyten Oxydase-negativ, nur ganz vereinzelte zeigten spärliche Granula.

Bei einem Fall von lymphatischer Leukämie mit 100 000 Leukozyten ergab die vergleichsweise Auszählung folgende Prozentzahlen:

	bei Giemsa-Färbung:	bei Oxydase-Reaktion:
Granulozyten	11,5 %	14,0 %
Lymphozyten	86,0 %	84,0 %
Monozyten	2,5 %	2,0 %

Hierbei weisen die Monozyten eine etwas intensivere Bestäubung mit blauen Körnchen auf als in den früheren Fällen. Indessen können diese exogener Natur sein, denn auch auf den Lymphozyten fanden sich die gleichen Granula, freilich nicht in so beträchtlicher Menge. Außerdem aber ist es zweifelhaft, ob die als Monozyten angesehenen Zellen wirklich solche waren; es können vielmehr Myelozyten oder jugendliche Myeloblasten vorgelegen haben, die bei der Giemsafärbung deutlich nachweisbar waren; überdies bestand auch eine sehr starke Reizung (Kernverschiebung) der wenigen Granulozyten.

Bei einem Fall von myeloischer Leukämie mit 500 000 Leukozyten sah ich im Blutausstrich eine enorme Menge von Myelozyten, bezw. Myeloblasten, die bei unregelmäßiger Kernform vielleicht mit Monozyten verwechselt werden könnten. Sie waren über das ganze Präparat gleichmäßig verteilt und zeich-

neten sich durch leuchtend blau granuliertes Protoplasma aus. Alle Monozyten jedoch, bezw. alle wirklich monozytenähnlichen Zellen, die nur in ganz verschwindender Prozentzahl zu sehen waren, waren völlig frei von Oxydasereaktion.

Von Tieren wurden Kaninchen und Meerschweinchen in die Untersuchung einbezogen. Das Kaninchenblut jedoch ist für die Prüfung auf Oxydasereaktion der Monozyten sehr wenig geeignet, da es nur wenig Zellen dieser Gattung enthält.

Im Meerschweinchen ergaben sich folgende Durchschnitts-Prozentwerte:

	bei Giemsa-Färbung:	bei Oxydase-Reaktion
Eosinophile	—	2,5 %
Amphophile*	30,5 %	25,0 %
Lymphozyten	62,5 %	64,0 %
Monozyten	7,0 %	8,5 %

Die amphophilen und eosinophilen Leukozyten waren wie im menschlichen Blute deutlich Oxydase-positiv, Erythrozyten und Lymphozyten deutlich negativ. Ebenso verhielten sich die Monozyten: sie waren ohne jede Oxydasereaktion. Als Monozyten waren sie an den in ihnen enthaltenen Kurloffkörperchen von den Lymphozyten scharf abgrenzbar, so daß über ihre Identität kein Zweifel bestehen konnte.

Die bis jetzt beschriebenen Resultate beziehen sich auf Blutausstriche, die alle mindestens vier bis fünf Stunden alt waren, d. h. es waren wenigstens vier bis fünf Stunden von der Herstellung bis zu ihrer Untersuchung verstrichen. Ein etwas abweichendes Ergebnis erhält man, wenn man ganz frische Ausstriche untersucht, bei denen also gleich, nachdem sie lufttrocken geworden waren, die Oxydasereaktion angestellt wurde. Dabei konnte ich feststellen, daß, abgesehen von den neutrophilen und eosinophilen Leukozyten, deren Protoplasma wie sonst mit leuchtend blauen Granulis angefüllt war, auch Lymphozyten und Monozyten eine Andeutung von Oxydasereaktion aufwiesen. Auf beiden Zellarten fanden sich vereinzelte blaue Granula verteilt, teilweise auf das Protoplasma beschränkt, teilweise sich aber auch über die ganze Zelle erstreckend, also auch auf den Kern. Monozyten und Lymphozyten machten jedoch einen Unterschied, insofern als jene mehr blaue Granula aufwiesen als diese, jedoch bei weitem nicht in dem Maße wie z. B. die neutrophilen Leukozyten.

Die Monozyten zeigten vereinzelt diese Körnchen nicht in ganz gleichmäßiger Verteilung auf dem Protoplasmaleib, sondern bei manchen waren sie in Gruppen um ein Zentrum angeordnet.

---

* Vertreten die Neutrophilen beim Meerschweinchen.

Und dabei hatte es den Anschein, als ob die Granula nicht an der Zellgrenze Halt machten, sondern als ob sie diese überschritten und über sie in die Umgebung der Zelle herausquollen. Außerdem aber fanden sich, wie schon früher beschrieben, vereinzelte blaue Granula über das ganze Präparat verteilt, auf Erythrozyten, Lymphozyten und Monozyten liegend. Diese müssen von vornherein für eine positive Oxydasereaktion der Monozyten ausgeschlossen werden. Desgleichen sind diejenigen Zellen abzusondern, bei denen Protoplasma und Kern mit den blauen Granulationen versehen waren, denn diese sind wohl exogener Natur; oxydasehaltige Granula liegen aber nur im Protoplasma, nicht auch im Kern. Dagegen könnte es sich bei denjenigen Monozyten, in deren Protoplasma blaue Körnchen lagen, um wirkliche Oxydasereaktion handeln, wenn auch um eine flüchtige.

Wenn ein etwa drei Viertelstunden alter zweiter Blutausstrich von derselben Person untersucht wurde, von der der erste stammte, so zeigte sich, daß die Zahl der Granula im Protoplasma der Monozyten bedeutend geringer geworden war im Vergleich zu dem ersten ganz frischen Präparat. Und bei noch älteren Ausstrichen wurden die oben erwähnten Befunde erhoben, d. h. die überwiegende Mehrzahl der Monozyten reagierte nicht auf die Oxydase. Es mag sich da vielleicht um flüchtige Oxydasen handeln, die in frischen Blutausstrichen nachweisbar sind, in älteren jedoch nicht mehr. Solche flüchtigen Oxydasen sind z. B. von v. Gierke beschrieben worden; er glaubt, zwischen resistenten und labilen Oxydasen unterscheiden zu müssen. (Münchener medizinische Wochenschrift 1911, Nr. 44.)

Der Versuch, die blauen Granula auf den Monozyten in ganz frisch hergestellten Präparaten als Fettkörnchen zu identifizieren, mißlang, denn die Blutzellen nahmen das verwendete Sudan III kaum an, sondern sie waren nur als ganz schwach hellgelbe Scheiben sichtbar. Indophenolblau ist nämlich ein starkes Fettfärbemittel, wie die Schnittuntersuchung bestätigt (s. weiter unten).

Bei dem schon angeführten Fall von lymphatischer Leukämie konnte an einem gleich nach dem Trockenwerden untersuchten Blutausstrich ungefähr dasselbe Ergebnis festgestellt werden: es war wieder ein Teil der Lymphozyten und Monozyten mit blauen Körnchen bestäubt, diese mehr als jene. Der Unterschied in der Intensität der Reaktion bei Monozyten und Granulozyten war ein ganz erheblicher, denn diese zeigten eine unvergleichlich viel stärkere Granulierung. Ob dieser Befund auch für die Möglichkeit des Bestehens einer flüchtigen Oxydase bei den Monozyten verwendet werden kann, ist fraglich, immerhin liegt die Möglichkeit vor, daß die ge-

sehenen Körnchen exogener Natur waren (körnig oder flüssig zugeführt).

Im großen und ganzen möchte ich die Ergebnisse meiner Untersuchungen betreffend die Oxydasereaktion der Monozyten dahin zusammenlassen: Die große Mehrzahl der Monozyten gibt keine Oxydasereaktion, und bei denjenigen von ihnen, die anscheinend doch eine schwache Reaktion aufweisen, ist sie möglicherweise durch Granula exogener Natur vorgetäuscht.

Mit diesen Worten stelle ich mich auf den Boden der Untersuchungen, die Reschad und Schilling über die Oxydasereaktion bei Monozyten angestellt haben. So fanden sie bei der Erörterung eines Falles von Splenozyten-Leukämie (Münchener medizinische Wochenschrift 1913, Nr. 36), daß bei Monozyten keine Oxydasereaktion nachweisbar sei, und höchstens ein ganz schwacher blauer Schimmer oder sehr selten auch einzelne blaue Körnchen sich bei ihnen nachweisen ließen. In den Blutgefäßen fanden sie starke Ansammlungen von Monozyten, gleichfalls ohne Oxydasereaktion. Jagic und Neukirch finden im Blut chronischer Myelämien mononukleäre Zellen, von denen sie sagen, sie seien als Myeloblasten anzusehen, wenn sie positive Oxydasereaktion geben. Die Monozyten scheinen sie demnach für Oxydase-negativ zu halten, jedoch sagen sie es nicht ausdrücklich. (Berliner klinische Wochenschrift, 1910, Nr. 19.) W. H. Schultze gibt an, daß sich nur die granulierten Zellen der Knochenmarksreihe mit Indophenolblau blau färben, nämlich Myelozyten, Leukozyten und Mastzellen. Ich glaube, daraus entnehmen zu dürfen, daß auch Schultze die Monozyten für frei von Oxydasereaktion hält (Münchener medizinische Wochenschrift 1909, Nr. 4).

Ferner zitiere ich die Arbeit von Schilling „Ueber hochgradige Monozytosen mit Makrophagen bei Endokarditis ulcerosa und über die Herkunft der großen Mononukleären", in der er sagt, daß die in allen Neutrophilen stark positive Oxydasereaktion den gewöhnlichen Blutmonozyten völlig fehlt (Seite 2). Im Blutausstrich und im „dicken Tropfen" fand er an Monozyten wiederum die Oxydasereaktion völlig negativ (Seite 10). Bei dem zweiten in der genannten Arbeit beschriebenen Fall von Endokarditis ulcerosa war gleichfalls die Oxydasereaktion an Monozyten negativ.

Demgegenüber steht die Ansicht von Nägeli, der in seinem Lehrbuch der klinischen Hämatologie (Seite 105) sagt: „Die Monozyten geben die Oxydasereaktion in gleicher Stärke wie Neutrophile". Auf Seite 177 weist er nochmals auf die positive Indophenolbausynthese hin, von der er sagt, sie gäbe in jedem

Monozyten massenhaft blau gefärbte Körnchen wie bei den myeloischen Zellen, im Gegensatz zu dem völligen Versagen der Lymphozyten. Nach der Ansicht von Dunn, der im Nägelischen Lehrbuch zitiert wird, färben sich die Monozyten, als seien sie myeloische Zellen.

Nägeli selbst schließt mit den Worten, seine Prozentauszählungen an Vergleichspräparaten mit zahlreichen Uebergangsformen ergäben, daß tatsächlich sämtliche die Indophenolblausynthese aufwiesen. Eine briefliche Mitteilung von Schultze, der schreibt, er fände die großen Mononukleären und Uebergangsformen nicht mehr, seit er die Reaktion anstelle, glaubt Nägeli als eine Bestätigung ihrer positiven Reaktion ansehen zu können. Diese Tatsache, daß in einem Präparat, an dem die Oxydasereaktion vorgenommen worden ist, die Monozyten nicht mehr zu sehen sind, scheint mir, da Nägeli eine Gegenfärbung nicht besonders erwähnt, dafür zu sprechen, daß sie eben keine Reaktion geben, ebenso wie Lymphozyten und Erythrozyten, während hingegen die myeloischen Blutzellen infolge ihrer intensiven Blaufärbung leicht zu erkennen sind.

Bingel zitiert in einer Arbeit (Deutsche medizinische Wochenschrift, 1916, Nr. 49) die Ansicht einiger Autoren, wonach die Monozyten sich von Knochenmarkszellen ableiten; „für diese Ansicht scheint der positive Ausfall der Oxydasereaktion der Monozyten zu sprechen."

Endlich sei eine sehr eingehende Arbeit des Japaners Yasuo Ikeda angeführt (Mitteilungen aus der medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Universität zu Tokyo, Band XIII, Heft 1). Dieser Autor findet bei Ausführung der Oxydasereaktion nach der Schultzeschen Methode einen positiven Ausfall derselben nur in weißen Blutzellen myeloischen Ursprungs.

Auf Grund der eigenen Untersuchungen halte ich die Monozyten im großen und ganzen für Oxydase-negativ. Es galt nun des weiteren festzustellen, wie sich die Zellen in Bezug auf die Oxydasereakiton verhalten, von denen sich die Monozyten ableiten. Ich fuße dabei auf den neueren Ansichten von Aschoff und Kiyono, wonach die Retikulo-Endothelien in Milz, Leber und Knochenmark den Ursprung der Monozyten darstellen (Folia haematologica, 1913, Band XV, Heft 3 und 1914, Band XVIII, Heft 3). Vor allem wurde Gewicht auf den Befund in den Kupfferschen Sternzellen der Leber gelegt. Ebenso wie Aschoff und Kiyono hält Schilling das Retikulo-Endothelsystem für den Ursprung der Monozyten.

Andere Autoren sind zwar anderer Ansicht bezüglich der Genese der Monozyten, so z. B. Nägeli, der sie für myeloische Elemente hält. Pappenheim und Ferrata wiederum halten dafür, daß die Monozyten lymphozytären Charakters sind, und sind

der Ansicht, daß es eine gemeinsame Stammzelle für lymphoide Parenchymzellen und Granulozyten gäbe (Folia haematologica 1910, Band X, Heft 1 und 1911, Band XII, Heft 1). Auch Frumkin ist der Meinung, die Monozyten ständen den Lymphozyten näher als den Leukozyten (Folia haematologica 1911, Band XII). Wenn man sich auf den Boden der Retikulo-Endothel-Abstammung stellt, so muß man außer den Kupfferschen Sternzellen die Pulpazellen der Milz in die Untersuchung einbeziehen, denn die Verwandtschaft beider Gewebsarten steht fest. Lepehne spricht sogar von „Milzgewebe in der Leber" und kommt zu dem Schluß, daß die Kupfferschen Sternzellen mit den Sinusendothelien den Retikulum- und Pulpazellen der Milz nahe verwandt, ja fast identisch mit ihnen seien (Deutsche medizinische Wochenschrift 1914, Nr. 27).

Zunächst wurden Tupfpräparate von Leber, Milz und Knochenmark eines Kaninchens hergestellt, und zwar von jedem Organ zwei, von denen an dem einen die Oxydasereaktion angestellt, das zweite nach Giemsa gefärbt wurde, damit so die Zellen auch nach dieser Färbemethode diagnostiziert werden konnten.

In dem Tupfpräparat der Milz fanden sich zahlreiche große runde bis ovale Zellen mit großem Kern und nur ziemlich wenig Protoplasma. Sie waren als sogenannte Splenozyten zu erkennen und ohne Blaufärbung, also frei von Oxydasereaktion. Ebenso verhielten sich fertige Monozyten. Diese Splenozyten machten das Gros aller Zellen aus; einige blaue Klumpen fanden sich über das Präparat verstreut. Sie waren jedoch nicht zu identifizieren, da sie in ihrer ganzen Ausdehnung blaugefärbt waren und keine deutliche Kernstruktur erkennen ließen. Ferner waren einige Zellen des myeloischen Systems zu erkennen an der lebhaft blauen Granulierung ihres Protoplasmas und an dem segmentierten Kern, der ungefärbt, bezw. bei Gegenfärbung mit Karbolfuchsin, rot tingiert war.

Bei Lebertupfpräparaten fielen wieder die Granulozyten durch ihre deutlich positive Oxydasereaktion auf, während alle andern Zellen keine Reaktion gaben, also Leberzellen und Monozyten. Die Leberzellen sind an ihrer unregelmäßigen, teilweise gelappten Gestalt erkennbar, außerdem sind sie viel größer als Monozyten und haben einen relativ kleinen Kern. Einzelne von ihnen waren mit ein paar blauen Körnchen bedeckt, die sogar stellenweise in Gruppen und Haufen angeordnet waren. Da aber Leberzellen nun nie Träger von Oxydasen sind, so können sie auch keine Oxydasereaktion geben, und die auf ihnen liegenden blauen Körnchen sind exogener Natur. Diese Beobachtung der blauen Körnchen in einzelnen Leberzellen dient zur Bestätigung der Ansicht, daß die Mono-

zyten im kreisenden Blut gleichfalls exogen positiv erscheinen können.

Ferner fanden sich einige Kupffersche Sternzellen über das Präparat versprengt. Sie waren an ihrer Spindel- oder Sternform zu erkennen und zeichneten sich dadurch aus, daß sie keine Oxydasereaktion gaben. Sie enthielten freilich oft blaue Körnchen, die aber als Fetteinschlüsse anzusehen sind und sich mit dem Indophenolblau, das ja ein Fettfärbemittel ist, blau gefärbt hatten. Darauf wird später bei dem Bericht über die Befunde der Organschnitte ausführlicher zurückzukommen sein. Im Tupfpräparat vom Knochenmark überwogen die Zellen des myeloischen Systems, vornehmlich fanden sich Myeloblasten und Myelozyten, die sich durch ihre deutliche Oxydasereaktion auszeichneten. Nur ganz vereinzelt waren dazwischen ungefärbte Zellen verstreut, die wohl als Monozyten anzusprechen waren, deren Identität jedoch nicht einwandfrei festzustellen war. Ganz dasselbe Resultat ergaben Tupfpräparate von Leber, Milz und Knochenmark, die von einer 45-jährigen Frau stammten, die an einem Mamma-Karzinom gestorben war. Es zeigten also Monozyten, ihre Vorstufe, die Splenozyten, und ferner die Kupfferschen Sternzellen keine Oxydasereaktion, sondern nur die Zellen der myeloischen Reihe waren positiv.

Drittens kamen Tupfpräparate von einem Kinde zur Untersuchung, das im Alter von vier Monaten an einer Toxikose (Nährschaden) ad exitum gekommen war. Gegenfärbungen wurden dabei mit Borax-Methylenblau vorgenommen. In einem Präparat der Leber fanden sich große runde Zellen mit deutlicher Oxydasereaktion. Genau zu diagnostizieren war die Mehrzahl von ihnen nicht, denn da sie außerordentlich stark blau gefärbt waren, waren die Zellgrenzen sogar in unregelmäßiger Weise von vielen blauen Granulis überlagert, und ebenso war der Kern von solchen Körnchen bedeckt. Diese Zellen gaben die Reaktion sogar so stark, daß ihre Umgebung in ziemlich weitem Umkreise blau bestäubt war und außerdem über das ganze Gesichtsfeld kleine blaue Pünktchen verteilt lagen, die wohl als Körnchen aufzufassen sind, die von den großen blauen Zellen herstammten.

Ferner fanden sich ein paar große runde Zellen mit großem rundem bis ovalem, exzentrisch gelegenem Kern. Dieser war durch das zur Gegenfärbung verwendete Borax-Methylenblau schwächer violett gefärbt als das Protoplasma. Diese Zellen waren alle ohne Oxydasereaktion. Die Erythrozyten waren als blasse violette Scheiben zu erkennen. Die Kupfferschen Sternzellen zeigten keine Reaktion, wohl aber enthielten einzelne von ihnen blau gefärbte phagozytierte Massen, die wahrscheinlich weiße Blutkörperchen waren. Andere wieder enthielten

aufgenommene Erythrozyten und Blutplättchen, und in noch anderen schließlich fanden sich unregelmäßig konturierte Klümpchen, die teilweise sich aneinander gelagert hatten. Von diesen Klümpchen konnte jedoch nicht mit Bestimmtheit entschieden werden, ob es sich um phagozytierte Massen handelte. Außerdem waren ziemlich zahlreiche große Oxydase-negative Zellen zu erkennen, die in ihren Kernen Nukleolen enthielten. Diese Zellen sahen aus wie Monozyten und waren frei von Blaufärbung. Leberzellen waren vollständig Oxydase-negativ.

Im Knochenmarktupfpräparat überwogen wieder Zellen der myeloischen Reihe, und zwar an erster Stelle die Myelozyten. Ihr Protoplasma war überall mit intensiv blau gefärbten Körnchen belegt. Einige ungefähr wie Monozyten aussehende Zellen zeigten diese Bestäubung mit blauen Körnchen ebenfalls, wenn auch nicht in so hohem Grade wie die Myelozyten. Es können ebensowohl Myeloblasten wie Monozyten gewesen sein, die durch Uebertragung der Oxydase mitreagierten. Selbst Nägeli schreibt, daß ihm die Feststellung von echten Monozyten im Knochenmark unter der Masse der Zellen nicht recht gelingt.

Das Tupfpräparat von der Milz ließ große runde bis ovale Zellen erkennen, z. T. mit schmalem Protoplasmasaum, z. T. anscheinend fast ganz ohne Protoplasma. Alle diese Zellen zeigten keine Oxydasereaktion. Ferner waren einige Zellen zu erkennen, die wie neutrophile Leukozyten aussahen, und deren Protoplasma dicht blau bestäubt war. Sie hatten einen hufeisenförmigen oder segmentierten Kern, waren also sicher keine Monozyten.

Des weiteren erstreckten sich meine Untersuchungen auf einen Fall von myeloischer Leukämie. Im Tupfpräparat der Milz waren im Gegensatz zu den früheren Fällen alle sichtbaren Zellen blau granuliert. Es waren große runde Zellen mit schmalem Protoplasmasaum, und sie konnten als Angehörige des myeloischen Systems erkannt werden. Die Oxydasereaktion in ihrem Protoplasma war so stark, daß zahlreiche blaue Granula über das ganze Gesichtsfeld verstreut waren; selbst einige Endothelien waren mit solchen Körnchen belegt. Monozyten konnte ich nicht mehr feststellen.

In Präparaten von Leber und Knochenmark zeigte sich das schon geschilderte Bild, nur herrschten hier die vielen Myelozyten mit ihrer starken Oxydasereaktion vor, so daß andere Zellarten oft nicht oder kaum sichtbar waren.

Als Gesamtergebnis der Tupfpräparate von Leber, Milz und Knochenmark kann also festgestellt werden, daß Monozyten, ihre Urform, die Splenozyten und Kupfferschen Sternzellen keine Oxydasereaktion zeigten.

Als letzte Untersuchungen fertigte ich eine Reihe von Gelatineschnitten von Milz, Leber und auch vom Knochenmark an, um an ihnen die Retikulo-Endothelien studieren zu können.

Zunächst wurden die Organe eines Kaninchens geprüft. Dabei verwandte ich die Lösungen der beiden Farbstoffe α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin unverdünnt, da sonst gute und brauchbare Resultate nicht zu erzielen waren. Es zeigte sich nämlich, daß die Oxydasereaktion nur in Zellen der Randpartien des Organschnittes nachweisbar war, während im Zentrum des Schnittes gar keine oder doch nur eine sehr geringe Reaktion sich fand. Es scheint also, daß die zur Einbettung der Schnitte verwendete Gelatine das Eindringen der Oxydasereaktion verlangsamte. Als Gegenfärbemittel gelangten Neutralrot oder Karbolfuchsin zur Anwendung. Jedoch waren die damit gewonnenen Ergebnisse nur zum Teil befriedigend, da die Zellen anscheinend das Neutralrot nicht gern annahmen, sondern nur einen schwachen rotbraunen Schimmer bekamen, der keine guten Kontraste gegenüber dem intensiven Indophenolblau ergab. Dasselbe fand ich bei Gegenfärbung mit Alaunkarmin, die in der Schultzeschen Vorschrift angegeben ist. Auch das Karbolfuchsin zeitigte nur teilweise gute Resultate, denn die Verteilung des Farbstoffes in den Präparaten war recht ungleichmäßig. Am weitesten bin ich mit Gegenfärbungen mit Hämalaun gekommen, in dem die Schnitte jedoch höchstens eine bis zwei Minuten verweilen dürfen, da sonst die Zellen überfärbt werden und das Blau der Oxydasereaktion ganz verdeckt wird.

An Schnitten der Kaninchenleber konnten etwa folgende Befunde erhoben werden: Die Leberzellen waren an ihrer strahligen Anordnung zu erkennen; sie gehen radiär von der Zentralvene aus und liegen zwischen den Kapillaren. Sie sind alle frei von Oxydasereaktion. In den Leberzellbalken lagen vereinzelte runde, große, blau gefärbte Zellen, die indessen nicht zu identifizieren waren. Die Kapillaren waren gleichfalls an ihrer strahligen Anordnung zu erkennen. Die in ihnen liegenden Erythrozyten waren als braune, teilweise übereinander liegende und sich deckende gelbbraune Scheiben sichtbar. Zwischen ihnen eingesprengt lagen einzelne dunkelblau gefärbte granulierte Leukozyten. Die Kupfferschen Sternzellen endlich waren an ihrer Lage längs des Kapillarrohres und an ihrer länglichen spindel- und sternförmigen Gestalt zu erkennen. Diese Zellen waren ohne Oxydasereaktion. Indessen enthielten sie zahlreiche Einschlüsse, teils von kugeliger, teils von mehr länglicher oder ovaler Gestalt. Diese Einschlüsse waren tiefblau gefärbt und hoben sich dadurch von dem eigentlichen Sternzellenplasma deutlich ab, das ungefärbt oder durch Gegenfärbung mit Karbolfuchsin rot tingiert war. Sie waren so als Einschlüsse, die

von der Zelle aufgenommen waren, deutlich zu erkennen und zeichneten sich durch ihre Größe und ihre scharfen, nicht gezackten Konturen vor den blauen Körnchen der Granulozyten im Blutausstrich aus. Diese Einschlüsse stellen sicher Fetttröpfchen dar. Denn bei Anstellung der Fettreaktion mit Sudan III und Gegenfärbung mit Hämalaun hatten in den Kupfferschen Sternzellen dieselben runden kugeligen Gebilde, die bei der Oxydasereaktion dunkelblau gefärbt waren, einen leuchtend roten Farbton angenommen. Damit ist bewiesen, daß es sich in beiden Fällen um Fettröpfchen handelt, die in den Sternzellen liegen und einmal mit Indophenolblau blau, das andere Mal mit Sudan rot gefärbt waren. Bei kombinierter Oxydasereaktion mit Fettfärbung ergaben die beschriebenen Kugeln in den Sternzellen eine braune Färbung, also nicht rot, wie bei der Fettfärbung allein. Diese Tönung ist auf die doppelte Färbung mit Indophenolblau und Sudan zurückzuführen, und die Kugeln sind in der Tat als Fettröpfchen anzusehen, die vom Indophenolblau und Sudan zusammen braun gefärbt worden sind. Daß die Kupfferschen Sternzellen phagozytäre Eigenschaften haben, ist durch zahlreiche Untersuchungen bewiesen. So berichtet z. B. Mac Nee, daß sie sogar rote Blutkörperchen oder Kernreste derselben aufspeichern (Medizinische Klinik 1913, Nr. 28). Ebenso zeigten Schilling und andere, daß die Sternzellen endotheliale und phagozytäre Elemente sind, die Fetteinschlüsse und Pigmente enthalten können (Virchows Archiv 1909, Band 196).

In dem vom Kaninchen angefertigten Milzschnitt ergab sich, daß die Mehrzahl der Milzzellen keine Oxydasereaktion gab. Die Pulpazellen selbst waren gleichfalls Oxydase-negativ, aber zwischen ihnen lagen, zu kleinen Haufen angeordnet, dunkelblaue Zellen der myeloischen Reihe. In den Follikeln waren solche Zellhaufen nicht anzutreffen. Erythrozyten waren nicht sichtbar, auch nicht bei Gegenfärbung mit Neutralrot. Wie im Leberpräparat fanden sich auch hier gelbbraune Niederschläge von dem zur Fixierung verwendeten Formalin. Ferner wurden Gelatineschnitte von Milz und Leber der beiden schon angeführten zur Sektion gekommenen Fälle angefertigt, nämlich des Kindes mit der Toxikose und der Frau mit dem Brustdrüsenkrebs.

Die Befunde stimmten im großen und ganzen mit den am Kaninchen erhobenen überein. Nur waren bei dem Kinde die Kupfferschen Sternzellen der Leber ganz besonders mit Einschlüssen von Fettröpfchen angefüllt, die sich mit Indophenolblau blau und mit Sudan rot färbten. Da der Säugling an einer Infektion zu Grunde gegangen war, kann dieser Reichtum der Sternzellen an phagozytiertem Fett nicht wundernehmen. Die Sternzellen selbst zeigten jedoch keine Oxydasereaktion, ebenso

die Pulpazellen der Milz nicht, nur waren zwischen ihnen wieder einzelne dunkelblaue neutrophile und eosinophile Leukozyten eingestreut.

Bei der erwähnten Frau sah ich im Leberschnitt blaue Zellen, nämlich neutrophile und eosinophile, in nicht sehr bedeutender Zahl hauptsächlich an der Peripherie der Leberläppchen und im intraazinösen Gewebe. Die blauen Kugeln und Klumpen in den Sternzellen erwiesen sich bei vergleichsweiser Sudanfärbung als Fetteinschlüsse, können also nicht für eine positive Oxydasereaktion der Sternzellen in Betracht kommen. Ferner zeigten mit Vorliebe solche Sternzellen auch auf dem Zelleib blaue Körnchen, die in der Nähe von blau granulierten Neutrophilen lagen. Sie hatten von diesen die Granula aufgestreut erhalten, wie im Blutausstrich oft von einem stark blauen Granulozyten blaue Körnchen in seiner Umgebung ausgebreitet liegen. Sie sind also exogener Natur und für positive Oxydasereaktion der Sternzellen nicht beweisend. Manche von ihnen konnten eine solche vortäuschen dadurch, daß sie außer Einschlüssen von Fett noch Reste von myeloischen Zellen enthielten, die natürlich Oxydase-positiv waren.

Das Gros der Milzzellen erwies sich als frei von Oxydasereaktion. Unter der Kapsel sah ich eine Anzahl von blauen Zellen, unter denen ein Teil als der myeloischen Reihe zugehörig erkannt werden konnte. In der Pulpa lagen auch Haufen und Gruppen derselben blauen Zellen, während die Follikel daran frei waren. Diejenigen Zellen, die im ungefärbten Präparat schwarze Kugeln von Formalinniederschlägen enthielten, gaben dieselben Kugeln nach Anstellung der Oxydasereaktion teils in schwarzer, teils in blauer Farbe wieder. Die Zellen selbst hatten segmentierte Kerne, sind also Granulozyten. Im Organpräparat fällt in ihnen die Oxydasereaktion teilweise mehr klumpig aus als im Blutausstrich, was mit einem Verfettungs- oder Verdauungsvorgang innerhalb der Zellen zusammenhängen mag. Hier ist die Auffassung von Pappenheim und Nakano wichtig, daß nicht die Oxydasekörnchen selbst sich färben, sondern daß die im Plasma diffus gebildeten Farbstoffe die vorhandenen Gebilde anfärben. (Folia haematologica, Bd. XIV, 1913, Heft 3.) Diese Protoplasmaanteile sind im Schnitt verklumpt (Leichenschädigung?).

Schließlich stellte ich noch an Organschnitten des schon erwähnten Falles von myeloischer Leukämie die Oxydasereaktion an, auch mit unverdünnten Lösungen von α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin zu gleichen Teilen und getrennt von einander. Im Leberschnitt enthielten die Kapillaren außer Erythrozyten sehr zahlreiche deutlich Oxydase-positive Myeloblasten. Ihre Kerne nahmen die Gegenfärbung mit Karbol-

fuchsin nur schlecht an. Die Leberzellen fand ich wieder ohne Reaktion. Die Kupfferschen Sternzellen erwiesen sich zum großen Teil als ohne jede Spur von Oxydasereaktion, nur zeigten sie, wenigstens teilweise, die blauen Einschlüsse, die entweder Fettröpfchen darstellten oder exogener Natur waren. An einzelnen der Zellen konnte deutlich das durchscheinende Weißgrau des Zelleibes, wie es sich in den Fortsätzen und Ausläufern der Sternzellen darbot, von dem Blau der von den Zellen aufgenommenen Massen unterschieden werden. Als ich an dem Präparat, an dem die Oxydasereaktion angestellt war, von der Seite des Deckglases her mit Fließpapier eine alkoholische Lösung von Sudan durchsog, konnte ich aufs deutlichste erkennen, wie die erst blauen Fettkügelchen in den Sternzellen jetzt eine braune Färbung bekamen; es handelte sich also wirklich um Einschlüsse von Fett. In einzelnen der Zellen blieb der blaue Farbton erhalten, und es lagen in diesen Fällen Trümmer von phagozytierten Leukozyten vor, wie an der Blaufärbung und an den Resten der segmentierten Kerne zu erkennen war.

In Gelatineschnitten von der Milz war das ganze Gesichtsfeld mit Zellen bedeckt, deren Protoplasma mit zahlreichen blauen Granulis gefüllt war. Ihre Kerne waren sehr groß und von runder bis ovaler Gestalt, so daß aus ihrer Form darauf geschlossen werden konnte, daß es sich um Myeloblasten handelte. In der Pulpa fanden sich diese Zellen gleichfalls ziemlich zahlreich eingestreut, selbst bis in die Follikel hinein lagen sie, wenn auch bei weitem nicht in der Menge we in der Pulpa.

An Schnitten einer Lymphdrüse waren die Lymphräume mit denselben blauen Zellen übersät, die ich in der Milz gesehen hatte. Die Follikel waren jedoch im allgemeinen frei von ihnen, nur in einzelnen waren von der Umgebung her blaue Myeloblasten eingedrungen, die sich von dem sonst ungefärbten Untergrung aufs schärfste abhoben.

Monozyten konnte ich weder in der Milz noch in der Drüse nachweisen; es überwogen die Myeloblasten in solcher Menge, daß andere Blutzellen daneben ganz in den Hintergrund traten oder von ihnen verdeckt waren.

Im Schnitt von Knochenmark des Myeloikers war das ganze Präparat von großen runden, blau gefärbten Zellen bedeckt, die auch einen großen runden Kern und verhältnismäßig nur wenig Protoplasma besaßen. Es waren also auch, in der überwiegenden Mehrzahl wenigstens, wieder Myeloblasten. Die Oxydasereaktion war so stark, daß das Präparat lange in den beiden Farblösungen liegen mußte, ehe eine deutliche Oxydasereaktion eintrat. Es wäre sonst nicht genügend Indophenolblau vorhanden gewesen, mit dem die Zellen eine deutliche Reaktion hätten geben können. Bei kurzer Färbung erschienen sie in der Tat

nur ganz schwach blau, und allein die am Rande des Präparates liegenden Zellen ergaben einen dunkleren Farbton. Monozyten waren in dem Knochenmarkspräparat nicht nachweisbar.

Bei Anstellung der Fettfärbung mit Sudan ergab sich, daß keine der beschriebenen Blutzellen in Milz, Drüse und Knochenmark sich rot färbte. In der Leber waren verfettete Zellen in den Kapillaren nachweisbar, und in den Kupfferschen Sternzellen lagen leuchtend rote Tropfen und Kügelchen von Fett, die denjenigen entsprachen, die mit Indophenolblau blau gefärbt waren. Es ist also auch hier keine Oxydasereaktion in den Kupfferschen Sternzellen vorhanden, sondern es handelt sich um eine Blaufärbung der Fetteinschlüsse durch Indophenolblau.

Das Resultat in dem Falle der myeloischen Leukämie läßt sich also auch dahin zusammenfassen, daß die Retikulo-Endothelien, d. h. die Zellen, von denen Monozyten abzuleiten sind, keine Oxydasereaktion geben.

In der Literatur findet sich bei Reschad und Schilling die Angabe, daß in dem von ihnen zuerst beschriebenen Fall von Splenozytenleukämie sie alle erkennbaren Splenozyten in Milz und Leber frei von Oxydase gefunden hätten und eine solche mit positivem Ausfall nur in Zellen des myeloischen Systems hätten nachweisen können. (Münchener medizinische Wochenschrift 1913, Nr. 36). Das würde also mit den von mir gefundenen Resultaten übereinstimmen. Eine entgegengesetzte Ansicht vertritt der schon zitierte Japaner Yasuo Ikeda, der an Schnitten von Kaninchenlebern die Kupfferschen Sternzellen mit positiver Oxydasereaktion findet. Die Leberzellen und die Epithelien der kleinen Gallengänge hält auch er für frei von Oxydase. In Milz und Leber von myeloisch leukämischen Leichen hat er an den leukämischen Infiltraten deutliche Oxydasereaktion nachweisen können.

Wenn mit einigen Sätzen noch auf die klinische Bedeutung der gefundenen Resultate eingegangen werden soll, so sind es die folgenden:

Die Monozyten stehen entschieden im Gegensatz zum eigentlich myeloischen System. Die Nägelische Auffassung von der myeloischen Abstammung der Monozyten, die sich gerade auf den gleichen positiven Ausfall der Oxydasereaktion stützt, wird also nicht bewiesen. Das Verhalten der Reaktion widerspricht demnach nicht der von Schilling besonders vertretenen Anschauung einer ganz selbständigen Bedeutung der Monozyten. Selbst wenn eine flüchtige Oxydasereaktion in ganz frischen Präparaten bestehen würde, so wäre sie doch ganz verschieden von der stabilen Reaktion der Granulozyten und ähnlich auch in anderen Zellen, sogar Lymphozyten, zu sehen.

Wenn also auch die Oxydasereaktion in einem ganz selbständigen Monozytensystem ebensowohl positiv wie negativ sein könnte, ohne daß dieses für Lymphozyten- oder Granulozyten-Verwandtschaft beweisend ist, so kann ich sagen, meine Ergebnisse passen besonders gut zu einer selbständigen Stellung der Monozyten und widersprechen einer nahen Verwandtschaft mit den Granulozyten. Auch stimmt die negative Oxydasereaktion mit der ebenfalls negativen Reaktion im Retikulo-Endothel überein. Es kann sogar die klinische Forderung aufgestellt werden, daß die Zellen von selbständigen Monozytosen negativ oder fast negativ (Reschad und Schilling) und nicht wie Granulozyten stark positiv reagieren (Nägeli). Das selbständige Verhalten des Monozytensystems erhöht natürlich die klinische Bedeutung, die noch weiter eingehend erforscht werden muß.

Schlußsätze.

1. Die Monozyten sind im Prinzip ohne Oxydasereaktion.
2. Die Zellen, von denen die Monozyten vermutlich abstammen, also Retikulo-Endothelien der Leber, Pulpazellen der Milz und einige Elemente des Knochenmarks, sind gleichfalls Oxydase-negativ.
3. Die beste Untersuchungsmethode für Oxydasereaktion ist die am unfixierten Präparat mit physiologischer Kochsalzlösung als Lösungsmittel für die beiden Farbstoffe α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin und Gegenfärbung mit Karbolfuchsin oder Borax-Methylenblau.

Die vorliegende Arbeit ist in der 1. medizinischen Klinik der Charité entstanden. Ich erlaube mir, sowohl Herrn Geheimen Medizinalrat Prof. Dr. His, der das Referat darüber gütigst übernommen hat, als auch Herrn Stabsarzt Dr. Schilling für seine Anleitung, seine selbstlose Unterstützung und die mir zur Verfügung gestellten Hilfsmittel meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literatur

Aschoff und **Kiyono**: Folia haematologica (Archiv) 1913, Band XV, Heft 3 und 1914, Band XVIII, Heft 3.

Bingel: Deutsche medizinische Wochenschrift 1916, Nr. 49.

Frumkin: Folia haematologica (Archiv) 1911, Band XII.

Fursenko: Zieglers Beiträge zur pathologischen Anatomie und allgemeinen Pathologie. 1911; Band 22.

v. Gierke: Münchener medizinische Wochenschrift 1911, Nr. 44.

Gräff: Zentralblatt für Pathologie 1916, Nr. 14.

Jagic und **Neukirch**: Berliner klinische Wochenschrift 1910, Nr. 19.

Lepehne: Deutsche medizinische Wochenschrift 1914, Nr. 27.

Nägeli: Lehrbuch der klinischen Hämatologie 1919, 3. Auflage.

Nakano: Folia haematologica (Archiv) 1913, Band XV, Heft 1.

Mc Nee: Medizinische Klinik 1913, Nr. 28.

Pappenheim und **Ferrata**: Folia haematologica (Archiv) 1910, Band X, Heft 1 und 1911, Band XII, Heft 1.

Pappenheim und **Nakano**: Folia haematologica (Archiv) 1913, Band XIV, Heft 3.

Reschad und **Schilling**: Münchener medizinische Wochenschrift, 1913, Nr. 36.

V. Schilling: a) Uhlenhutsches Handbuch der mikroskopischen Technik (im Druck); b) „Ueber hochgradige Monozytosen mit Makrophagen bei Endokarditis ulcerosa, und über die Herkunft der Großen Mononukleären". (Zeitschrift für klinische Medizin. Band 88, Heft 5 und 6. 1920.) c) Virchows Archiv 1909, Band 196.

Schmorl: „Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden", 1920.

W. H. Schultze: a) Zieglers Beiträge zur pathol. Anatomie und allgem. Pathologie 1909, Band 45. b) Zentralblatt für Pathologie 1917, Band 28. c) Münchener medizinische Wochenschrift 1909, Nr. 4.

Winkler: Folia haematologica (Archiv) 1912, Band XIV.

Yasuo Ikeda: Mitteilungen aus der medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Universität zu Tokyo. Band XIII, Heft 1.

Lebenslauf

Am 25. April 1893 wurde ich als Sohn des Oberlehrers Professor Dr. Schlenner zu Berlin geboren. Ich bin evangelischer Konfession und besuchte von Michaelis 1899 bis Ostern 1912 die hiesige Luisenstädtische Oberrealschule, die ich nach bestandenem Abiturientenexamen verließ. Ich begann meine Studien als Mediziner auf der Berliner Friedrich-Wilhelm-Universität im Sommersemester 1912 und bestand im März 1913 die für Oberrealschüler vorgeschriebene nachträgliche Prüfung im Lateinischen. Vom 1. April bis zum 30. September 1913 diente ich mit der Waffe als Einjährig-Freiwilliger beim Königin-Augusta-Garde-Grenadier-Regiment Nr. 4 und wurde als Sanitätsgefreiter der Reserve entlassen. Zu Beginn des Wintersemesters 1913 wurde ich auf der Kaiser-Wilhelms-Akademie für das militärärztliche Bildungswesen immatrikuliert, der ich bis zur Beendigung des Staatsexamens als Studierender angehörte. Bei Kriegsausbruch wurde ich einberufen zum Heeresdienst und kam mit der Reserve-Eisenbahn-Baukomp. 25 im Oktober 1914 ins Feld. Ich gehörte ihr als Sanitäts-Unteroffizier bis zum Oktober 1916 an und war mit ihr in Ostpreußen, Polen, Galizien, Ungarn, Serbien, Mazedonien und Bulgarien. Dann wurde ich zur Kriegslazarett-Abtlg. 54 nach Uesküb (Mazedonien) versetzt. Vom Januar bis zum März 1917 wurde ich nach Ernennung zum Sanitäts-Vizefeldwebel zur Ablegung des Physikums nach Berlin beurlaubt, im April 1917 zum Feldunterarzt und im Mai 1918 zum Feldhilfsarzt befördert. Nach dem Rückzug vom Balkan wurde ich bei Ausbruch der ungarischen Revolution von den Serben auf kurze Zeit in Werschetz (Südungarn) interniert, und nach Rückkehr in die Heimat Ende November 1918 wurde ich aus dem Heeresdienst entlassen. Ich nahm in Berlin meine Studien wieder auf, begann Ende Januar 1920 das medizinische Staatsexamen und beendete es am 2. Juni d. J. Seit dem 1. Juli 1920 bin ich als Volontärarzt am Berliner städtischen Krankenhaus am Urban beschäftigt.

Fritz Schlenner.